kaneka

カネカ 簡易RNA抽出キット(RT-PCR用) 取扱説明書

注意

■本品は研究用です。ヒト、動物への医療、臨床診断に使用しないでください。また、食品、化粧品、家庭用品などとしても使用しないでください。

■本品の使用、廃棄にあたっては、保護具（保護手袋、保護メガネなど）着用や、皮膚に付着した場合はよく水洗するなど、実験室での一般の注意事項を厳守し安全に留意してください。

特徴／用途

■本品は、従来法より簡便な操作で、RT-PCRなどのRNA検出・定量法に利用可能な鋳型RNAを約30分にて生体試料から簡易抽出するためのキットです。本品は特に動物由来の培養細胞や血液からのRNA抽出に適しております。

製　品

内容物 (100テスト分)		
試　薬 A	2 ml	1 本
Deoxyribonuclease I (DNase I)	0.1 ml	1 本

※本品は、出荷前検査において、マウス血液を含む検体からRNAを抽出し、RT-PCRにより増幅断片が検出されることを確認しております。

保存方法／使用期限

■**保存方法**　本品は冷凍にてお届けします。お受け取り後は、試薬A、DNase Iは－20 ℃で保存してください。
また、試薬Aが凍結している場合は、実験前に完全に融解させ、よく撹拌してからご使用ください。
なお、試薬Aは融解後、－20 ℃～4 ℃でも保存可能です。

■**使用期限**　本品のラベルに記載しております。

カネカ 簡易RNA抽出キット(RT-PCR用)

使用方法

■標準プロトコール

(培養細胞の場合)

1. 細胞数が10^3〜10^6個となるように調製した培養液を遠心チューブに移す。
2. 遠心チューブを1000 rpmにて3 分間遠心する。収集した細胞ペレットを剥がさないように上清の培養液を静かに除去する。
3. 細胞ペレットにPBS(-)を100 μl加え、ピペッティングにより細胞を再懸濁する。遠心チューブを1000 rpmにて3 分間遠心後、上清を除去し細胞を収集する。
4. 細胞の入った遠心チューブに試薬Aを20 μl添加し、ピペッティングにより、よく撹拌し懸濁する。懸濁液を新しいPCRチューブに移す。
5. 懸濁液が入ったPCRチューブをヒートブロックなどにて75 ℃で5 分間インキュベートする。
6. PCRチューブを室温まで冷却した後、DNase Iを1 μl添加し、ピペッティングにより撹拌する。その後、ヒートブロックなどにて42 ℃で10 分間、75 ℃で5 分間インキュベートする。
7. インキュベートした溶液※1 1〜2 μlを鋳型RNAとして逆転写反応に使用する(25 μl反応系の場合)※2。

(血液の場合)

1. 20 μlの試薬AをPCRチューブに添加する。
2. ステップ1のPCRチューブに、ヘパリンなどの抗凝固剤※3を添加した新鮮血0.5〜2.0 μlを添加し、ピペッティングにより、よく撹拌する。
3. ステップ2のPCRチューブをヒートブロックなどにて75 ℃で5 分間インキュベートする。
4. PCRチューブを室温まで冷却した後、DNase Iを1 μl添加し、ピペッティングにより撹拌する。その後、ヒートブロックなどにて42 ℃で10 分間、75 ℃で5 分間インキュベートする。
5. インキュベートした溶液※1 1〜2 μlを鋳型RNAとして逆転写反応に使用する(25 μl反応系の場合)※2。

※1 検体の種類や状態によってはインキュベートした溶液に沈殿物が見られる場合があります。
沈殿物の除去は必須の工程ではありませんが、沈殿物を除去する場合は、PCRチューブを、4 ℃、5000 rpmにて5 分間遠心し、上清を回収してください。

※2 抽出液は、すみやかにRT-PCRなどに使用することをお薦めいたします。抽出液を使用する際は氷上にて保持し、保存時は−20 ℃以下で保存してください。

※3 ヘパリン、EDTAを添加した血液からRNA抽出可能であることを確認しております。

使用例

■培養細胞からのRNA抽出及びRT-PCRによる検出結果

10^5 個に調製した接着細胞(HEK293T)または浮遊細胞(Jurkat)から、本品を用いてそれぞれのRNAを抽出した。抽出液を鋳型RNAとし、PrimeScript® One Step RT-PCR kit Ver. 2(タカラバイオ社製)を用いて、T3000 Thermocycler(Biometra社製)にてACTB mRNAを標的としたRT-PCRを実施した。RT-PCR産物を電気泳動に供し、鋳型RNA特異的な増幅断片を検出した(図1, 2)。また、検体に含まれるゲノムDNAが抽出液に残存していないことを確認するため、抽出液を鋳型とし、*TaKaRa Ex Taq*®(タカラバイオ社製)を用いてT3000 Thermocycler(Biometra社製)にてPCRを実施した。PCR後の溶液を電気泳動に供し、増幅断片が検出されないことを確認した(図1, 2)。

■マウス血液からのRNA抽出及びRT-PCRによる検出結果

抗凝固剤としてヘパリンを添加したマウス血液から、本品を用いてRNAを抽出した。抽出液を鋳型RNAとし、PrimeScript® One Step RT-PCR kit Ver. 2(タカラバイオ社製)を用いてT3000 Thermocycler(Biometra社製)にて、H3f3a mRNAを標的としたRT-PCRを実施した。RT-PCR産物を電気泳動に供し、鋳型RNA特異的な増幅断片を検出した(図3)。
また、検体に含まれるゲノムDNAが抽出液に残存していないことを確認するため、抽出液を鋳型とし、*TaKaRa Ex Taq*®(タカラバイオ社製)を用いてT3000 Thermocycler(Biometra社製)にてPCRを実施した。PCR後の溶液を電気泳動に供し、増幅断片が検出されないことを確認した(図3)。
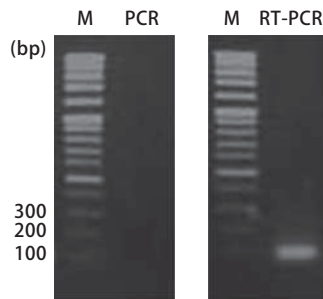
図1. HEK293T細胞から抽出したRNAのPCR/RT-PCR結果
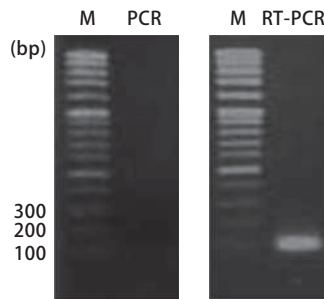
図2. Jurkat細胞から抽出したRNAのPCR/RT-PCR結果
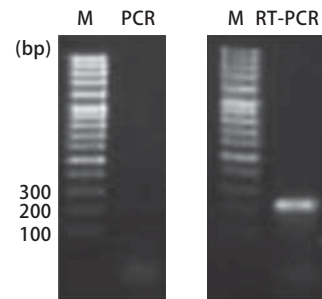
図3. マウス血液から抽出したRNAのPCR/RT-PCR結果

保　証

■弊社の責任の範囲は、本品自体に不具合があった場合の代替品への交換のみに限られ、直接・間接を問わずその他一切の損害について弊社はその責に任じません。あらかじめご了承ください。

廃棄方法

本品の取扱いの際は必ず保護具(保護手袋や保護メガネなど)を着用してください。

■残余廃棄物　少量であればペーパータオルやウエスに吸収させて焼却処分する。

■汚染容器及び包装　容器を廃棄する場合、内容物を完全に除去した後に処分する。

使用上の注意

1. 標準プロトコールにてRT-PCRにより増幅断片が確認されない場合は、以下の操作を行うことで改善されることがあります。
   - 使用する検体量を最適化する。
     (培養細胞の場合:細胞数10^3〜10^6個の範囲、血液の場合:0.5〜2.0 μlの範囲)
   - プロトコールの途中で作業を中断せず、作業をすみやかに実施する。
   - 抽出液をすみやかにRT-PCRに使用する。
   - より新鮮な検体または適切に保存された検体を使用する。
   - RT-PCR条件やプライマーを最適化する。
2. RNAはRNaseにより容易に分解する恐れがあります。作業時は、コンタミネーションに十分注意し、使用するチューブやチップなどは、全てRNaseフリーの製品を使用してください。
   抽出液を使用する際は、氷上にて保持し、保存時は−20 ℃以下で保存してください。

お問い合わせ先

カガクでネガイをカナエル会社

株式会社カネカ　バイオ・メディカル事業開発部
〒530-8288 大阪市北区中之島2-3-18
TEL 06-6226-4264　FAX 06-6226-4848
URL　http://www.kaneka-labtest.com